

0

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-112437

(43)Date of publication of application : 24.04.2001

(51)Int.Cl.

A23L 1/28  
A23C 9/12  
C12N 1/20  
//(C12N 1/20  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 11-295300

(71)Applicant : YAKULT HONSHA CO LTD

(22)Date of filing : 18.10.1999

(72)Inventor : TSUJI HIROKAZU

SHIMAKAWA YASUHISA

MIURA MIKA

IKEMURA HARUO

MORISHITA TAKASHI

(54) PRODUCTION OF FOOD AND DRINK CONTAINING BACTERIA OF GENUS  
BIFIDOBACTERIUM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a process for the economical production of a food or drink such as fermented milk and yogurt containing bacteria of the genus Bifidobacterium and having high survival ratio of the bacteria in the product.

SOLUTION: The objective process for the production of a food or drink containing bacteria of the genus Bifidobacterium is characterized by the introduction of a step to decrease the proliferation speed of the bacteria during the cultivation of the bacteria without stopping the metabolism of the bacteria.

CLAIMS

---

## [Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the Bifidobacterium bacteria content eating-and-drinking article characterized by introducing the process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of these bacteria in the middle of culture of the Bifidobacterium bacteria.

[Claim 2] The process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of the Bifidobacterium bacteria is following (a) - (d).

(a) The manufacture approach according to claim 1 which is 1 chosen from the process to which pH of the process (d) culture medium to which the osmotic pressure of the process (c) culture medium to which the temperature of the process (b) culture medium to which the amount of dissolved oxygen in culture medium is made to increase is changed is changed is changed, or 2 or more.

[Claim 3] The process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of the Bifidobacterium bacteria is following (a) - (d).

(a) It is 3 ppm about the amount of dissolved oxygen in the middle of culture. Or the manufacture approach according to claim 1 which is 1 chosen from the process to which pH of the process (d) culture medium which carries out 150-800mOsm change of the osmotic pressure of the original culture temperature to the 3 - process (c) culture medium changed 14 degrees C for the temperature of the process (b) culture medium made to increase even to a saturation state from the original osmotic pressure is changed from the original pH 0.3-3 times, or 2 or more.

[Claim 4] The eating-and-drinking article containing the Bifidobacterium bacteria obtained by the approach according to claim 1, 2, or 3.

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the Bifidobacterium bacteria content eating-and-drinking article obtained by the manufacture approach of the eating-and-drinking article with which the survivability of the Bifidobacterium bacteria which have the outstanding bioactive has been improved, and this approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] The Bifidobacterium bacteria are bacteria with which it grows up to people's large intestine mostly, and the ready intestines effectiveness and the depressor effect of a disease germ are accepted. For this reason, it is used for many ingesta, such as fermented milk and solid yogurt.

[0003] However, since the Bifidobacterium bacteria are generally weak to oxygen or low pH, they are difficult to maintain the number of micro organisms after commercial production. For example, if the container of permeability is filled up with the ingesta containing the Bifidobacterium bacteria, the number of microorganism will decrease in response to the effect of oxygen at the time of product preservation. Moreover, in the product of a low pH region like fermented milk, there is a problem that the number of microorganism of the Bifidobacterium bacteria will decrease during preservation. Furthermore, in case it produces commercially, in order to add syrup etc., there is also a problem of the reduction of number of microorganism by osmotic pressure and reduction of the number of microorganism by temperature. Thus, when number of microorganism decreases after producing commercially to fermented milk etc., the physiological function of the Bifidobacterium bacteria, such as fermented milk, will decline. For this reason, the number-of-microorganism maintenance at the time of product preservation has been an important technical problem, the paper pack which usually vapor-deposited aluminum, glassware, etc. are used as a container material, and the attempt which maintains the inside of a container at an anaerobic condition is made. However, as for \*\*\*\*, \*\* does not have the effect of the oxygen at the time of restoration of a container.

[0004] Moreover, on the other hand, the method of improving the survivability of the Bifidobacterium bacteria is proposed. For example, the survivability improvement approach of the Bifidobacterium bacteria which add fermented milk 1L per 0.2-1.0 mols of sorbitols is indicated by JP,57-4291,B. Moreover, the approach of adding erythritol as a survivability improvement agent is indicated by JP,6-253734,A.

[0005] However, addition of such a survivability improvement agent of the Bifidobacterium bacteria caused the rise of a manufacturing cost, and also the room of an improvement remains in the survivability improvement effect, and offer of a survivability remedy with more high practicality is called for.

[0006] Furthermore, the inclination for natural flavor to be liked is strong and recent years require the manufacturing method which improves survivability without using an additive etc.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, the purpose of this invention has a survival rate in the inside of products, such as fermented milk and yogurt, in offering the economical manufacturing method of the high Bifidobacterium bacteria content eating-and-drinking article.

[0008]

[Means for Solving the Problem] When adding the process at which a proliferation rate is reduced in the middle of culture of the Bifidobacterium bacteria, without stopping the metabolic turnover of these bacteria as a result of this invention person's inquiring wholeheartedly in view of this actual condition, header this invention was completed for a bacteria content eating-and-drinking article with a subsequent high survival rate being obtained.

[0009] That is, the eating-and-drinking article containing these bacteria obtained by the manufacture approach of the Bifidobacterium bacteria content eating-and-drinking article characterized by this

invention introducing the process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of these bacteria in the middle of culture of the Bifidobacterium bacteria, and this manufacture approach is offered.

[0010]

[Embodiment of the Invention] In this invention, the process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of the Bifidobacterium bacteria is a process to which various kinds of environmental factors in which the optimum conditions at the time of the Bifidobacterium bacterial culture have become settled, i.e., osmotic pressure, a culture medium pH, dissolved oxygen concentration, culture temperature, etc. are changed from the usual culture condition within limits which do not stop the metabolic turnover of a bacillus. Usually, since it was thought that the Bifidobacterium bacteria receive a trauma and the extinction is promoted if these environmental factors are worsened, the process which gives them intentionally was not applied at the time of manufacture of the Bifidobacterium bacteria content eating-and-drinking article. Although the usual culture condition incidentally changes with strains, generally it is about 30-39 degrees C in osmotic pressure 150 - 900mOsm (milli OZUMO), pH 4.0-7.0, 0-2 ppm of dissolved oxygen concentration, and culture temperature.

[0011] However, by introducing such a process in the middle of culture, the survivability of the Bifidobacterium bacteria has been improved and this invention person found out that the survivability in the inside of the eating-and-drinking article containing especially this was good.

[0012] The following are mentioned as a process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of the Bifidobacterium bacteria.

(a) the process to which pH of the process (d) culture medium to which the osmotic pressure of the process (c) culture medium to which the temperature of the process (b) culture medium to which the amount of dissolved oxygen in culture medium is made to increase is changed is changed is changed -- these -- at least one -- two or more -- put together -- you may come out. In addition, the process which adds the matter which has surface activity operations, such as a bile solution, as other processes is mentioned.

[0013] Although what is necessary is not to restrict the application stage of the above-mentioned process, but just to determine in consideration of the Bifidobacterium \*\*\*\*\* number of microorganism and culture time amount, generally it is desirable to apply at the anaphase of culture and the stage when the cell mass concentration of the Bifidobacterium bacteria is especially set to  $7 \times 10^7$  cfu/ml -  $1.5 \times 10^9$  cfu/about ml  $1 \times 10^7$  cfu/ml -  $1.5 \times 10^9$  cfu/ml. returning the changed environmental factor is for the activity of a bacillus to fall, when it is needed to the excessive additive for subsequent growth taking time amount or returning pH, temperature, etc., if number of microorganism applies this process in a  $1 \times 10^7$  cfu/ml [ about / less than ] phase, and a process and cultivates more than to  $1.5 \times 10^9$  cfu/ml, since it is difficult. Moreover, if it is the above-mentioned range, suitable survivability can be obtained rather than it makes this process apply in the first half or the middle stage of culture.

[0014] Furthermore, as for the reaction time of this process, considering as 1 hours or more is desirable, and it is more desirable to carry out for 2 hours or more. Since it is thought that the protein for corresponding to the given environmental variation etc. is guided at the time of application of this process and it is thought that this derived protein has contributed to the survivability improvement in a certain form, for attaining sufficient induction, it is desirable to take the above-mentioned reaction time. Here, in order not to stop the metabolic turnover of a bacillus, it is necessary to perform the above-mentioned process by within the limits with a temperature of 30 degrees C - 42 degrees C. Namely, in preparation with syrup liquid after the culture medium currently performed by the Bifidobacterium bacteria content eating-and-drinking article production process, such as conventional fermented milk, cools, and addition of an acid, even if the environmental variation by osmotic pressure difference and pH difference occurs, a halt or since it has delayed very much, protein etc. is not fully guided and, as for the outstanding survivability, a metabolic turnover is not obtained. The process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of the bacillus in this invention is explained more to a detail.

[0015] (a) As a process to which the dissolved oxygen in the process culture medium to which the amount of dissolved oxygen in culture medium is made to increase is made to increase, the process which adds oxygen evolution (\*\*), such as an oxygen permutation process; inorganic substance of the ambient atmosphere in a stirring process; shaking process; fermenter of a cultivation tank (fermenter), a microorganism, and oxygen, is mentioned. If these oxygen supply means etc. make the amount of dissolved oxygen in the middle of culture increase, all can be used for them, and if processing of about 2 - 4 hours is performed about 4 hours before, especially the thing of a culture terminal point for which a high survivability improvement effect is acquired is possible for them. At this time, it is desirable the saturation oxygen density in 2 ppm - a culture medium and to maintain especially the dissolved oxygen concentration in a cultivation tank in the range of the saturation oxygen density in 3 ppm - a culture medium. 2 ppm It is because survivability improvement effect sufficient in the following is not acquired.

[0016] (b) A process, an addition process of an exothermic agent, etc. which add culture medium or syrup liquid of the water held at the warm water to a cultivation tank or a cold-water circulation process; elevated temperature, a milk culture medium, and a microorganism etc. as a process to which the process culture temperature to which the temperature of culture medium is changed is changed are mentioned. Also in this case, if processing of about 2 - 4 hours is performed about 4 hours before, the thing of a culture terminal point for which a high survivability improvement effect is acquired is possible, as for that culture temperature, it is desirable to change 3-12 degrees C from the original culture condition (for example, if it to be Bifidobacterium breve and Bifidobacterium bifidum 30-39 degrees C), and the thing for which about 6-12 degrees C was changed especially and which back-maintain is desirable. The change of less than 3 degrees C of a survivability improvement effect may be a little inadequate, and also when a bacillus becomes extinct above 14 degrees C, it is for being certain. In addition, although it is more desirable as a temperature change to raise temperature, in order to prevent extinction of the Bifidobacterium bacteria, it is desirable to consider as 42 degrees C or less.

[0017] (c) The mixed process of the process; warm water which is in the middle of culture and mixes the milk component of concentration process; Different which mixes syrup liquid with osmotic pressure higher than culture medium etc. to culture medium to culture medium as a process to which the osmotic pressure of the process culture medium to which the osmotic pressure of culture medium is changed is changed; inorganic or the mixed process of an organic acid is mentioned. In this case, although the osmotic pressure difference to change changes a little with original osmotic pressure, it is desirable to carry out 150-800mOsm change from the original culture condition (for it to be 600mOsm extent at about 20% of milk culture medium used as the usual culture medium), and the thing which was especially done for 200-400mOsm extent change and which maintain for back 2 hours or more is usually desirable. The change of less than 150 mOsms of a survivability improvement effect may be a little inadequate, and in 400 or more mOsms, also when a bacillus becomes extinct, it is for being certain. Moreover, since the production process top of an eating-and-drinking article is difficult for returning the changed osmotic pressure in many cases, as for this process, it is desirable to double with a culture terminal point and to apply suitably. In addition, although it is more desirable as osmotic-pressure change to raise osmotic pressure, since it is the same as that of (b), it is desirable to set the last osmotic pressure (or application back of a process) of a final product to 1000 or less mOsms.

[0018] (d) As a process to which pH of the process culture medium to which pH of culture medium is changed is changed, a mixed process with the culture medium of pH acid addition process; Different to the culture medium to the inside of culture medium or syrup liquid etc. is mentioned. Also in this case, if processing of about 2 - 4 hours is performed about 4 hours before, the thing of a culture terminal point for which a high survivability improvement effect is acquired is possible, as for the degree of that pH change, it is desirable to make it change from the original culture condition 0.3-3.0 times, and the thing which was made to change 0.5 to about 1.5 especially and which back-maintain is desirable. Less than 0.3 change of a survivability improvement effect may be a little insufficient, and or more in 3.0, also when a bacillus becomes extinct, it is for being certain. In addition, as pH change, it is more desirable to reduce pH and it is desirable to make the last (or application back of a process) pH of a product or less

into four to 5.5 like the above. Moreover, any are sufficient as inorganic acids, such as organic acids, such as a citric acid, a malic acid, a lactic acid, a succinic acid, an ascorbic acid, an acetic acid, and a pyruvic acid, a hydrochloric acid, and a sulfuric acid, etc., and the acid used by acid addition has a citric acid, a malic acid, and especially a desirable lactic acid from a flavor side.

[0019] Each above-mentioned process can be easily introduced into a production process, and survivability can be improved by combining this with other approaches of arbitration as it is or. These processes may be used combining one sort or two sorts or more.

[0020] On the other hand, the usual culture condition should just be used for culture processes other than the process which gives the above-mentioned factor. For example, about 0.05 to 5%, the oxygen density of culture medium performs 0-2 ppm (25 degrees C), and, as for osmotic pressure, 150 - 900mOsm and Initiation pH should just usually cultivate [ the cell mass concentration at the time of starter inoculation ] as 7.5-5.5. moreover, culture temperature should just cultivate as about 30 degrees C - 39 degrees C in accordance with the optimum temperature of each Bifidobacterium bacteria. Various culture-medium components may be suitably added in that case.

[0021] Especially the class of possible Bifidobacterium bacteria of using for the approach of this invention is not what is limited. For example, Bifidobacterium breve (Bifidobacterium breve), Bifidobacterium longum (Bifidobacterium longum), Bifidobacterium bifidum (Bifidobacterium bifidum), Bifidobacterium ANIMARISU (Bifidobacterium animalis), Bifidobacterium ZUISU (Bifidobacterium suis), Bifidobacterium in fan TISU (Bifidobacterium infantis), Bifidobacterium ADORESENTISU (Bifidobacterium adolescentis), etc. are mentioned.

[0022] Especially, many are used for dairy products from before, data, such as safety, are accumulated, and since the improvement effect of survivability is also high, Bifidobacterium breve and Bifidobacterium longum are desirable.

[0023] The culture medium of the Bifidobacterium bacteria obtained as mentioned above can be used as ingesta combining the sweeteners of remaining as it is or others, fruit juice, perfume, a thickener, etc. Especially as the food gestalt, a drink or solid yogurt etc. which fermented a fermented milk product, i.e., cow's milk, goat's milk, etc. with lactic acid bacteria is desirable. Moreover, it is also possible to use it as the hard candy which blended the excipient etc. in addition to this, health food, drugs, etc.

[0024] Moreover, as a Bifidobacterium bacteria eating-and-drinking article, when manufacturing a fermented milk product, lactic acid bacteria may be contained. Especially the lactic acid bacteria made to live together in a product are not limited. Lactobacillus KAZEI, Lactobacillus acid FIRUSU, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus helveticus, The Lactobacillus planter ram, Lactobacillus DERUBURUKKII, Lactobacillus crispatus, the Lactobacillus fur mentum, Streptococcus group bacteria [ , such as Lactobacillus group bacteria; Streptococcus thermophilus ], such as Lactobacillus reuteri and Lactobacillus ZEAE; An Enterococcus faecalis, All can be used suitably. Enterococcus bacteria [ , such as enterococcus FENUMU, ]; -- RAKUTOKOKKASU group bacteria, such as RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU, -- Especially, a point to Lactobacillus helveticus, RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU, Lactobacillus gasseri, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus KAZEI, and Lactobacillus acid FIRUSU, such as flavor and safety based on meal experience, are desirable. Moreover, it is also possible to use together with a microorganism different from these lactic acid bacteria, and to use.

[0025] In case change of the class of dissolved oxygen of process to be used, i.e., the amount, temperature, osmotic pressure, or pH is chosen, it is desirable to choose in consideration of a product gestalt, a design, workability, etc. For example, when using for products, such as fermented milk of the plane type which does not add sugar etc., it is desirable to apply the process to which the amount of dissolved oxygen and temperature are changed from points, such as workability.

[0026] Moreover, when adding a saccharide and manufacturing products, such as fermented milk of pH high type, the process to which osmotic pressure is changed is applied, and if the process of a fall of pH is used for a product with low pH, suitable survivability will be obtained simple.

[0027] Furthermore, although whichever of a permeability container and an anaerobic container may be used at the time of preservation, it is more desirable to use an anaerobic container.

[0028]

[Example] Next, although an example is given and this invention is explained in more detail, this invention is not restrained at all by these examples.

[0029] The Bifidobacterium bacteria survivability improvement effect of the approach to which the amount of dissolved oxygen is made to increase by the approach below the survivability improvement effect by the approach to which the amount of example 1 dissolved oxygen is made to increase was examined.

[0030] That is, the milk culture medium shown below was added to 3 liter-capacity KORUBEN, and 4065 shares of Bifidobacterium breve YIT was inoculated into it 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated for 11 to 12 hours, and 34 degrees C of  $1.0 \times 10^9$  /ml of culture medium were obtained. pH of this culture medium -- 5.7 and osmotic pressure -- 560mOsm(s) and the amount of dissolved oxygen -- about 1 ppm it was . What continued culture for 4 hours while stirring by 100rpm after that, and two kinds of culture medium which stopped stirring for further 2 hours and was cultivated after cultivating for 2 hours were produced. the place which measured the osmotic pressure and the amount of dissolved oxygen of culture medium after [ of an after / stirring initiation ] 120 minutes -- about 590 mOsm(s) and 7.5 ppm it was . In this way, all, the obtained culture medium was  $1.5 \times 10^9$  /ml, and pH was 5.3. To each cooled culture medium, the cold paratinose solution was added so that it might become the final concentration of 0.33 mols, and it sealed with the butyl plug so that a glass test tube might be filled up and air could not be touched. Moreover, the product using the culture medium cultivated to  $1.5 \times 10^9$  /ml was similarly produced as contrast, without stirring during culture. Thus, the survival rate on 7, 14, and the 21st at the time of 10-degree-C preservation of the obtained product group was measured. A result is shown in Table 1.

[0031] (Milk medium composition)

Whole milk powder 520g yeast extract 0.75g water Sterilization processing was carried out for 5 seconds at 135 degrees C after 2100g\* dissolution.

[0032]

[Table 1]

|         | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|---------|-----|------|------|------|
| 対 照     | 100 | 64.2 | 39.3 | 22.1 |
| 攪拌操作4時間 | 100 | 68.5 | 52.5 | 41.2 |
| 攪拌操作2時間 | 100 | 66.0 | 40.3 | 29.4 |

単位 (%)

[0033] The product which are in the middle of culture and manufactured by performing fixed period stirring showed survivability higher than the case of the product cultivated and manufactured by un-stirring so that clearly from this result.

[0034] The Bifidobacterium bacteria survivability improvement effect of the approach of raising temperature by the approach below the survivability improvement effect by the approach of raising example 2 temperature was examined.

[0035] That is, the milk culture medium same to 3L \*\* KORUBEN as an example 1 was added, and 4065 shares of Bifidobacterium breve YIT was inoculated 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated for 11 to 12 hours, and 34 degrees C of  $1.0 \times 10^9$  /ml of culture medium were obtained. pH of this culture medium was 5.7. After raising the temperature of this culture medium in each temperature of 37 and 40 or 42 degrees C, and cultivating after the temperature up for 2 hours at the culture medium which continued culture for 4 hours, and 42 degrees C, temperature was lowered to 34 degrees C and the culture medium cultivated for further 2 hours was obtained. The number of microorganism of these culture medium was 1.59 cfu(s)/ml and pH5.3. To the cooled culture medium, the cold paratinose solution was added so that it might become the final concentration of 0.33 mols, and it sealed with the butyl plug so that a glass test tube might be filled up and air could not be touched. Moreover, the product using the culture medium cultivated to  $3.0 \times 10^9$  /ml as contrast, without raising temperature



during culture was produced similarly. Thus, the survival rate on 7, 14, and the 21st at the time of 10-degree-C preservation of the obtained product group was measured. A result is shown in Table 2.

[0036]

[Table 2]

|                | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|----------------|-----|------|------|------|
| 対 照            | 100 | 64.2 | 39.3 | 22.1 |
| 温度上昇 (37℃)     | 100 | 65.6 | 42.1 | 25.0 |
| 温度上昇 (40℃)     | 100 | 75.0 | 52.1 | 38.0 |
| 温度上昇 (42℃、4時間) | 100 | 81.6 | 71.4 | 51.6 |
| 温度上昇 (42℃、2時間) | 100 | 80.7 | 68.2 | 45.7 |

単位 (%)

[0037] Survivability fixed [ 34 degrees C ] the product which was in the middle of culture, and it was made to go up from 34 degrees C to 37 or 42 degrees C, and manufactured culture temperature and higher than the product cultivated and manufactured was shown so that clearly from this result. processing temperature -- 37 degrees C -- the direction of 42 degrees C -- moreover, the processing time showed survivability with 4 hours higher than 2 hours.

[0038] The Bifidobacterium bacteria survivability improvement effect of the approach of raising osmotic pressure by the approach below the survivability improvement effect by the approach of raising example 3 osmotic pressure was examined.

[0039] That is, the milk culture medium same to 3L \*\* KORUBEN as an example 1 was added, and 4065 shares of Bifidobacterium breve YIT was inoculated 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated for 11 to 12 hours, and 34 degrees C of  $1.0 \times 10^9$  /ml of culture medium were obtained. 5.7 and the osmotic pressure of pH of this culture medium were about 640 mOsm(s). After adding the paratinose solution (about 1300 mOsm(s)) warmed to this culture medium at 34 degrees C so that it may become the final concentration of 0.33 mols, culture was continued for 4 hours and  $3.0 \times 10^9$  /ml of culture medium was obtained. pH of this culture medium was 5.4 and osmotic pressure was about 950 mOsm(s). The cooled culture medium was sealed with the butyl plug so that a glass test tube might be filled up and air could not be touched. Moreover, the product which added the cold paratinose solution to the culture medium cultivated to  $3.0 \times 10^9$  /ml as contrast, without adding a paratinose solution during culture was also produced. Thus, the survival rate on 7, 14, and the 21st at the time of 10-degree-C preservation of the obtained product group was measured. A result is shown in Table 3.

[0040]

[Table 3]

|       | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|-------|-----|------|------|------|
| 対 照   | 100 | 64.2 | 39.3 | 22.1 |
| 浸透圧上昇 | 100 | 79.2 | 58.0 | 40.4 |

単位 (%)

[0041] The product which it is in the middle of culture, the \*\* paratinose solution was added, and osmotic pressure was raised, and was manufactured so that clearly from this result showed survivability higher than the case of the product cultivated and manufactured, without raising osmotic pressure.

[0042] The Bifidobacterium bacteria survivability improvement effect of the process to which pH of culture medium is changed by the approach below the survivability improvement effect by the approach of changing pH of example 4 culture medium was examined. That is, the downward same milk culture medium as an example 1 was added to 3 liter-capacity KORUBEN, and 4065 shares of Bifidobacterium breve YIT was inoculated 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated for 11 to 12 hours, and 34



degrees C of  $1.0 \times 10^9$  /ml of culture medium were obtained. pH of this culture medium was 5.7. pH of culture medium was reduced to 4.4 and 5.4 using 2M malic-acid solution, and culture was continued at 34 degrees C for 4 hours. Only the thing of pH4.4 also obtained the culture medium of culture 2 hours. All were  $1.5 \times 10^9$  /ml of the culture medium of number of microorganism. After adding 2M sodium-hydroxide solution to each cooled culture medium and setting pH to 5.3, the cold paratinose solution was added so that it might become the final concentration of 0.33 mols, and it sealed with the butyl plug so that a glass test tube might be filled up and air could not be touched. Moreover, the product using the culture medium cultivated to  $1.5 \times 10^9$  /ml, without performing as contrast processing to which pH is changed was produced similarly. Thus, the survival rate on 7, 14, and the 21st at the time of 10-degree-C preservation of the obtained product group was measured. A result is shown in Table 4.

[0043]

[Table 4]

|              | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|--------------|-----|------|------|------|
| 対 照          | 100 | 64.8 | 40.0 | 19.5 |
| pH 4. 4. 2時間 | 100 | 65.3 | 49.0 | 28.2 |
| pH 4. 4. 4時間 | 100 | 75.1 | 52.0 | 38.0 |
| pH 5. 4. 4時間 | 100 | 66.6 | 50.7 | 31.0 |

単位 (%)

[0044] The product which pH was reduced in the middle of culture, and was manufactured showed survivability higher than contrast so that clearly from Table 4. pH after processing -- 5.4 -- the direction of 4.4 -- moreover, the processing time showed survivability with 4 hours higher than 2 hours.

[0045] The Bifidobacterium bacteria survivability improvement effect of the process which raises osmotic pressure by the approach below the survivability improvement effect by the process which raises example 5 osmotic pressure was examined.

[0046] That is, the milk culture medium same to 3 liter-capacity KORUBEN as an example 1 was added, and 4065 shares of Bifidobacterium breve YIT was inoculated 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated for 11 to 12 hours, and 34 degrees C of  $1.0 \times 10^9$  /ml of culture medium were obtained. 5.7 and the osmotic pressure of pH of this culture medium were about 590 mOsm(s). After adding 1M paratinose solution warmed to this culture medium at 34 degrees C so that a difference with the osmotic pressure of a culture medium may become with 74,134,230,262,353mOsm(s), culture was continued for 4 hours and  $1.5 \times 10^9$  /ml of culture medium was obtained. pH of this culture medium was 5.3. After adding each 1M paratinose solution cooled to each cooled culture medium so that it may be set to 0.33M, it sealed with the butyl plug so that a glass test tube might be filled up and air could not be touched. Moreover, the product which added the cold paratinose solution to the culture medium cultivated to  $1.5 \times 10^9$  /ml as contrast, without adding a paratinose solution during culture was also produced. Thus, the survival rate on 7, 14, and the 21st at the time of 10-degree-C preservation of the obtained product group was measured. A result is shown in Table 5.

[0047]

[Table 5]

| 浸透圧差mOsm | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|----------|-----|------|------|------|
| 対 照      | 100 | 64.6 | 40.0 | 21.4 |
| 7 4      | 100 | 59.1 | 41.0 | 21.2 |
| 1 3 4    | 100 | 65.4 | 42.4 | 21.5 |
| 2 3 0    | 100 | 64.6 | 42.6 | 28.6 |
| 2 6 2    | 100 | 67.4 | 43.4 | 35.3 |
| 3 5 3    | 100 | 79.8 | 57.9 | 39.8 |

単位 (%)

[0048] When osmotic pressure difference exceeded 134 so that clearly from Table 5, survivability higher than contrast was shown.

[0049] Except having used *Bifidobacterium longum* YIT4021 as survivability improvement effect strain by the approach to which the amount of example 6 dissolved oxygen is made to increase, it is the same conditions as an example 1, and the effect of the survivability on the amount of dissolved oxygen was considered. As a result, the survivability improvement effect was similarly acquired for *Bifidobacterium longum*.

[0050] With the application of various kinds of conditions, fermented milk was prepared on seven or less-example radical-main culture conditions, and the survivability at the time of preservation was compared with them.

(Basic condition) 420g of milk powder and I strike (Asahi Breweries, Ltd. make) 0.6g were dissolved in 1700g of water, what sterilized for 3.5 seconds at 135 degrees C was poured distributively 2L to 3 liter-capacity KORUBEN, and it considered as the milk culture medium. *Lactobacillus gasser* YIT0168 was inoculated into this milk culture medium for 4064 shares of *Bifidobacterium breve* YIT 0.1% 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated until the number of microorganism of *Bifidobacterium breve* was set to  $1.5 \times 10^9$  at 34 degrees C, and considered as culture medium. This culture medium is cooled at 10 degrees C, and it mixes with 1M 4-degree C glucose solution 1L, and is 150kg/cm<sup>2</sup> with a homogenization machine. It homogenized by the pressure and considered as fermented milk. In this way, the fermented milk (control) obtained and the sample possessing the following various conditions were prepared.

Operation article 1: Stirring was performed from 4 hours before culture termination for 2 hours, and during stirring, it maintained so that the dissolved oxygen of culture medium might be in a saturation state.

Operation Article 2: The operation article 3 which maintained culture temperature at 42 degrees C from 4 hours before culture termination to culture termination: Mixing with culture medium and 1M glucose solution was performed at 34 degrees C.

Operation article 4: The number of microorganism of *Bifidobacterium breve* is  $2 \times 10^8$ . The citric acid was added by stages; after carrying out 1.0 \*\*\*\*s of pH and maintaining it for 2 hours, it returned to the original pH with the sodium-hydroxide solution, and culture was continued.

while stirring mixing with 1M glucose solution 4 hours before Operation Article 5: culture termination -- 42 degrees C -- carrying out -- up to culture termination -- stirring -- and 42 degrees C of constant temperature were continued.

In this way, the obtained fermented milk was filled up with and sealed to the carboy, and standing preservation was carried out for 21 days at 10 degrees C. A result is shown in Table 6.

[0051]

[Table 6]

|        | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|--------|-----|------|------|------|
| コントロール | 100 | 60.6 | 33.4 | 19.1 |
| 実施品 1  | 100 | 67.3 | 42.5 | 30.2 |
| 実施品 2  | 100 | 76.3 | 64.9 | 42.2 |
| 実施品 3  | 100 | 75.5 | 56.0 | 38.8 |
| 実施品 4  | 100 | 69.9 | 52.4 | 40.3 |
| 実施品 5  | 100 | 85.2 | 77.0 | 64.1 |

単位 (%)

[0052] It turned out that the fermented milk which has the survivability excellent in providing the process at which a proliferation rate is reduced, without stopping the metabolic turnover of the Bifidobacterium bacteria can be manufactured the passage clear from Table 6. The survivability improvement effect at the time of applying this process even about 4 hours ago from the time of culture termination especially was excellent. Moreover, also after 21-day preservation, most of color tone change, separation, precipitate, etc. was not seen, but, as for this article, good stability was shown. Furthermore, this article had the outstanding flavor which is satisfactory at all also in respect of organic functions.

[0053] Example 8 520g of whole milk powder and I strike (Asahi Breweries, Ltd. make) 0.75g were dissolved in 2100g of water at manufacture 3 liter-capacity KORUBEN of fermented milk, and it sterilized for 5 seconds at 135 degrees C, and considered as the milk culture medium. Lactobacillus acid FIRUSU was inoculated into this milk culture medium for 4065 shares of Bifidobacterium breve YIT 0.1% 1%. After carrying out a cotton plug, it cultivated for 11 to 12 hours, and 34 degrees C of  $1.0 \times 10^9$  /ml of culture medium were obtained. Culture was continued for 4 hours, after adding 1M paratinose solution 0.84L warmed at 34 degrees C to this culture medium.  $2.0 \times 10^9$  /ml of culture medium was obtained. What covered this culture medium over the homogeneity machine, and was homogenized was used as fermented milk. pH of this fermented milk was [  $5 \times 10^7$  /ml and the number of lactobacillus bifidus of 5.4 and the number of lactic acid bacteria ]  $1 \times 10^9$  /ml.

[0054]

[Effect of the Invention] It becomes independently possible to improve the survivability of the Bifidobacterium bacteria and to heighten the physiology effectiveness at the time of intake, if it combines and introduces at the time of culture of the Bifidobacterium bacteria about the process at which a proliferation rate is reduced by this invention, without stopping the metabolic turnover of the Bifidobacterium bacteria. Moreover, the culture medium or culture obtained by this invention approach has good flavor, and can use it for the eating-and-drinking article of varieties.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-112437

(P2001-112437A)

(43) 公開日 平成13年4月24日(2001.4.24)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup>   | 識別記号 | F I           | テ-マコード(参考)  |
|-----------------------------|------|---------------|-------------|
| A 2 3 L 1/28                |      | A 2 3 L 1/28  | Z 4 B 0 0 1 |
| A 2 3 C 9/12                |      | A 2 3 C 9/12  | 4 B 0 1 8   |
| C 1 2 N 1/20                |      | C 1 2 N 1/20  | A 4 B 0 6 5 |
| // (C 1 2 N 1/20            |      | (C 1 2 N 1/20 | A           |
| C 1 2 R 1:01)               |      | C 1 2 R 1:01) |             |
| 審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 8 頁) |      |               |             |

(21) 出願番号 特願平11-295300

(22) 出願日 平成11年10月18日(1999.10.18)

(71) 出願人 000006884

株式会社ヤクルト本社

東京都港区東新橋1丁目1番19号

(72) 発明者 辻 浩和

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(72) 発明者 島川 康久

東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 発酵乳やヨーグルト等の製品中での生残率が高いビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の経済的な製造法を提供すること。

【解決手段】 ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中に、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を導入することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中に、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を導入することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法。

【請求項2】 ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程が次の(a)～

(d)

(a) 培養液中の溶存酸素量を増加させる工程

(b) 培養液の温度を変化させる工程

(c) 培養液の浸透圧を変化させる工程

(d) 培養液のpHを変化させる工程

から選ばれる1又は2以上である請求項1記載の製造方法。

【請求項3】 ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程が次の(a)～

(d)

(a) 培養途中の溶存酸素量を3ppm乃至飽和状態にまで増加させる工程

(b) 培養液の温度を元の培養温度から3～14℃変化させる工程

(c) 培養液の浸透圧を元の浸透圧から150～800mOsm変化させる工程

(d) 培養液のpHを元のpHから0.3～3変化させる工程

から選ばれる1又は2以上である請求項1記載の製造方法。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌を含有する飲食品。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、優れた生理活性を有するビフィドバクテリウム属細菌の生残性が改善された飲食品の製造方法及びこの方法により得られるビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品に関するものである。

【0002】

【従来の技術】ビフィドバクテリウム属細菌は人の大腸に多く成育し、整腸効果や病原菌の抑制効果が認められている細菌である。このため、発酵乳や固形ヨーグルトなど多くの飲食物に利用されている。

【0003】しかしながら、ビフィドバクテリウム属細菌は一般的に酸素や低pHに弱いので、製品化後の生菌数を維持することが困難である。例えばビフィドバクテリウム属細菌を含有する飲食物を通気性の容器に充填すると、酸素の影響を受け、製品保存時にその菌数が減少してしまう。また、発酵乳のような低pH域の製品中ではビフィドバクテリウム属細菌の菌数が、保存中に減少してしまうという問題がある。更に製品化する際、シロップ等を加えるため、浸透圧による菌数の減少及び温度による菌数の減少という問題もある。このように発酵乳等に

製品化した後に菌数が減少してしまうと、発酵乳等のビフィドバクテリウム属細菌の生理作用が減退することになる。このため、製品保存時の菌数維持が重要な課題となっており、通常はアルミを蒸着した紙バックや、ガラス容器等を容器素材として使用し、容器内を嫌気状態に保つ試み等がなされている。しかし容器の充填時の酸素の影響はまぬがれない。

【0004】また、一方ではビフィドバクテリウム属細菌の生残性を改善する方法が提案されている。例えば、特公昭57-4291号公報にはソルビトールを発酵乳1Lあたり0.2～1.0モル添加するビフィドバクテリウム属細菌の生残性改善方法が開示されている。また、特開平6-253734号公報にはエリスリトールを生残性改善剤として添加する方法が開示されている。

【0005】しかしながら、このようなビフィドバクテリウム属細菌の生残性改善剤の添加は、製造コストの上昇を招くうえに、その生残性改善効果には改善の余地が残っており、より実用性の高い生残性改善策の提供が求められている。

【0006】更に、近年では、自然な風味が嗜好される傾向が強くなり、添加剤等を使用しないで生残性を改善する製造法が要求されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、発酵乳やヨーグルト等の製品中での生残率が高いビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の経済的な製造法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】斯かる実状に鑑み本発明者は鋭意研究を行った結果、ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を加えれば、その後の生残率が高い細菌含有飲食品が得られることを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌の培養途中に、該細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を導入することを特徴とするビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の製造方法及びこの製造方法により得られた該細菌を含有する飲食品を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明において、ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程とは、ビフィドバクテリウム属細菌培養時の最適条件が定まっている各種の環境要因、すなわち、浸透圧、培地pH、溶存酸素濃度、培養温度等を、菌の代謝を止めない範囲内で、通常の培養条件から変化させる工程のことである。通常、これらの環境要因を悪化させるとビフィドバクテリウム属細菌が傷害を受け、その死滅が促進されるものと考えられているため、それらを故意に与える工程がビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品の

製造時に適用されることはなかった。因に通常の培養条件は菌種によって異なるが、一般的には浸透圧150～900mOsm(ミリオズモ)、pH4.0～7.0、溶存酸素濃度0～2ppm、培養温度30～39℃程度である。

【0011】しかしながら、このような工程を培養途中に導入することにより、ビフィドバクテリウム属細菌の生残性が改善され、特にこれを含有する飲食品中での生残性がよいことを本発明者は見出した。

【0012】ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程としては、次のものが挙げられる。

(a) 培養液中の溶存酸素量を増加させる工程

(b) 培養液の温度を変化させる工程

(c) 培養液の浸透圧を変化させる工程

(d) 培養液のpHを変化させる工程

これらは、いずれか1つでも、2以上の組み合わせであってもよい。なお、その他の工程としては、胆汁溶液等界面活性作用を有する物質を添加する工程等が挙げられる。

【0013】上記工程の適用時期は制限されず、ビフィドバクテリウム属細菌致達菌数と培養時間を考慮して決定すればよいが、培養の後期、一般にビフィドバクテリウム属細菌の菌体濃度が $1 \times 10^7$ cfu/ml～ $1.5 \times 10^8$ cfu/ml、特に $7 \times 10^7$ cfu/ml～ $1.5 \times 10^8$ cfu/ml程度となる時期に適用することが好ましい。変化させた環境要因を元に戻すことは困難であるため、菌数が $1 \times 10^7$ cfu/ml程度以下の段階で該工程を適用すると、その後の増殖に時間がかかってしまうか、pHや温度等を元に戻すための余分な添加物、工程までも必要となってしまう。1.5×10<sup>8</sup>cfu/ml以上まで培養してしまうと、菌の活性が低下してしまうためである。また、上記範囲であれば、培養の前半もしくは中盤において該工程を適用させるよりも、好適な生残性を得られるのである。

【0014】更に、該工程の作用時間は、1時間以上とすることが好ましく、2時間以上行うことがより好ましい。該工程の適用時には与えられた環境変化に対応するためのタンパク質等が誘導されていると考えられ、この誘導タンパク質が生残性改善に何らかの形で寄与していると考えられるため、充分な誘導を達成するには上記の作用時間を取ることが望ましいのである。ここで、菌の代謝を止めないために、上記の工程は温度30℃～42℃の範囲内で行う必要がある。すなわち、従来の発酵乳等ビフィドバクテリウム属細菌含有飲食品製造工程で行われていた、培養液の冷却した後のシロップ液との調合、酸の添加等では、浸透圧差、pH差による環境変化が起きても、代謝が停止又は非常に延滞しているため、タンパク質等が充分に誘導されず、優れた生残性は得られないのである。本発明における菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程をより詳細に説明する。

【0015】(a) 培養液中の溶存酸素量を増加させる工程

培養液中の溶存酸素を増加させる工程としては、培養槽(発酵槽)の攪拌工程；振盪工程；発酵槽内雰囲気酸素置換工程；無機物、微生物、酸素等の酸素発生(剤)を添加する工程等が挙げられる。これらの酸素供給手段等は、培養途中の溶存酸素量を増加させるものであればいずれも用いることができ、特に培養終点の4時間程度前から2～4時間程度の処理を行えば、高い生残性改善効果を得ることが可能である。このとき、培養槽中の溶存酸素濃度は2ppm～培地中の飽和酸素濃度、特に3ppm～培地中の飽和酸素濃度の範囲に維持することが好ましい。2ppm未満では十分な生残性改善効果が得られないためである。

【0016】(b) 培養液の温度を変化させる工程

培養液の温度を変化させる工程としては、培養槽への温水又は冷水循環工程；高温に保持された水、乳培地、微生物の培養液又はシロップ液等を添加する工程、発熱剤の添加工程等が挙げられる。この場合にも、培養終点の4時間程度前から2～4時間程度の処理を行えば、高い生残性改善効果を得ることが可能であり、その培養温度は元の培養条件(例えば、ビフィドバクテリウム・プレーベ、ビフィドバクテリウム・ビフィダムであれば30～39℃)から3～12℃変化させることが好ましく、特に6～12℃程度変化させた後維持することが好ましい。3℃未満の変化では、生残性改善効果がやや不十分な場合もあり、14℃以上では菌が死滅してしまう場合もあるためである。なお、温度変化としては、温度を上昇させることがより好ましいが、ビフィドバクテリウム属細菌の死滅を防ぐためには、42℃以下とすることが望ましい。

【0017】(c) 培養液の浸透圧を変化させる工程

培養液の浸透圧を変化させる工程としては、培養途中で培養液よりも浸透圧の高いシロップ液等を培養液に混合する工程；異なる濃度の乳成分を培養液に混合する工程；温水の混合工程；無機又は有機酸の混合工程等が挙げられる。この場合、変化させる浸透圧差は元の浸透圧によりやや異なるが、通常元の培養条件(例えば、通常の培地となる20%程度の乳培地では600mOsm程度)から150～800mOsm変化させることが好ましく、特に200～400mOsm程度変化させた後2時間以上維持することが好ましい。150mOsm未満の変化では、生残性改善効果がやや不十分な場合もあり、400mOsm以上では菌が死滅してしまう場合もあるためである。また、変化させた浸透圧を元に戻すことは、飲食品の製造工程上困難な場合が多いため、該工程は培養終点に合わせ適宜適用することが好ましい。なお、浸透圧変化としては、浸透圧を上昇させることがより好ましいが、(b)と同様の理由から最終製品の(又は工程の適用後の)最終浸透圧を1000mOsm以下とすることが望ましい。

## 【0018】(d) 培養液のpHを変化させる工程

培養液のpHを変化させる工程としては、培養液中への培養液への酸添加工程；異なるpHの培養液やシロップ液との混合工程等が挙げられる。この場合にも、培養終点の4時間程度前から2～4時間程度の処理を行えば、高い生残性改善効果を得ることが可能であり、そのpH変化の度合いは元の培養条件から0.3～3.0変化させることが好ましく、特に0.5～1.5程度変化させた後維持することが好ましい。0.3未満の変化では、生残性改善効果がやや不十分な場合もあり、3.0以上では菌が死滅してしまう場合もあるためである。なお、pH変化としては、pHを低下させることがより好ましく、上記と同様に製品の（又は工程の適用後の）最終pHを4～5.5以下とすることが望ましい。また、酸添加で使用する酸は、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、ゴハク酸、アスコルビン酸、酢酸、ヒルビン酸等の有機酸、塩酸、硫酸等の無機酸等いずれでもよく風味面からクエン酸、リンゴ酸、乳酸が特に好ましい。

【0019】上記工程は、いずれも容易に製造工程に導入できるものであり、これをそのままあるいは任意の他の方法と組み合わせることにより生残性を改善することができる。これらの工程は1種又は2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【0020】一方、上記因子を与える工程以外の培養工程は、通常の培養条件を用いればよい。例えば、スターター接種時の菌体濃度は0.05から5%程度、培養液の酸素濃度は通常0～2ppm（25℃）、浸透圧は150～900mOsm、初発pHは7.5～5.5として培養を行えばよい。また、培養温度はビフィドバクテリウム属細菌各々の至適温度にあわせおよそ30℃～39℃として培養を行えばよい。その際に様々な培地成分を適宜添加してもよい。

【0021】本発明の方法に用いることの可能なビフィドバクテリウム属細菌の種類は特に限定されるものではなく、例えば、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（*Bifidobacterium breve*）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（*Bifidobacterium longum*）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）、ビフィドバクテリウム・アニマリス（*Bifidobacterium animalis*）、ビフィドバクテリウム・ズイス（*Bifidobacterium suis*）、ビフィドバクテリウム・インファンティス（*Bifidobacterium infantis*）、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス（*Bifidobacterium adolescentis*）等が挙げられる。

【0022】中でもビフィドバクテリウム・ブレーベ及びビフィドバクテリウム・ロンガムは以前から乳製品に数多く使用され安全性等のデータが積み重ねられており、また、生残性の改善効果も高いため好ましい。

【0023】上記のようにして得られるビフィドバクテリウム属細菌の培養液は、そのままあるいは他の甘味

料、果汁、香料、増粘剤などと組み合わせて飲食物とすることができる。その食品形態としては、特に発酵乳製品、すなわち、牛乳、山羊乳等を乳酸菌により発酵させた飲料又は固形ヨーグルト等が好ましい。また、この他にも賦形剤等を配合した錠剤、健康食品、医薬品等として使用することも可能である。

【0024】また、ビフィドバクテリウム属細菌飲食品として、発酵乳製品を製造する場合、乳酸菌を含有してもよい。製品中に共存させる乳酸菌は特に限定されず、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ガセリ、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・プラントラム、ラクトバチルス・デルブルッキイ、ラクトバチルス・クリスタス、ラクトバチルス・ファーマメンタム、ラクトバチルス・ロイテリ、ラクトバチルス・ゼアエ等のラクトバチルス属細菌；ストレプトコッカス・サーモフィルス等のストレプトコッカス属細菌；エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェナム等のエンテロコッカス属細菌；ラクトコッカス・ラクチス等のラクトコッカス属細菌いずれも好適に使用することができ、特に、風味や食経験に基づく安全性などの点から、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトコッカス・ラクチス、ラクトバチルス・ガセリ、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・アシドフィルスが好ましい。また、これら乳酸菌とは別の微生物と併用して用いることも可能である。

【0025】用いる工程の種類、すなわち溶存酸素量、温度、浸透圧又はpHの変化を選ぶ際には、製品形態や設計、作業性等を考慮して選択することが好ましい。例えば、糖などを加えないプレーンタイプの発酵乳等の製品に用いる場合は、作業性等の点から溶存酸素量や温度を変化させる工程を適用することが好ましい。

【0026】また、糖類を添加し、pHの高いタイプの発酵乳等の製品を製造する場合は、浸透圧を変化させる工程を適用し、pHの低い製品にはpHの低下の工程を用いれば簡便に好適な生残性が得られる。

【0027】更に、保存時には通気性容器、嫌気性容器のどちらを使用してもよいが、嫌気性の容器を用いることがより好ましい。

【0028】

【実施例】次に実施例を挙げ本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例になんら制約されるものではない。

## 【0029】実施例1

溶存酸素量を増加させる方法による生残性改善効果

以下の方法にて、溶存酸素量を増加させる方法のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0030】すなわち、3リットル容コルベンに下に示す乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベY1T4065株を1%接種した。綿栓をした後、34



て、11～12時間培養し、 $1.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.7、浸透圧は560mOsm、溶存酸素量は約1ppmであった。その後100rpmで攪拌しながら4時間培養を継続したものと、2時間培養した後に更に2時間攪拌を止めて培養した培養液を2通り作製した。攪拌開始後120分後に培養液の浸透圧及び溶存酸素量を測定したところ、約590mOsm、7.5ppmであった。こうして得られた培養液は、いずれも $1.5 \times 10^9$ /ml、pHは5.3であった。冷却したそれぞれの培養液に、冷バラチノース溶液を終濃度0.33モルとなるように添加し、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中に攪拌せずに、 $1.5 \times 10^9$ /mlまで培養した培養液を用いた製品も同様に作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表1に示す。

#### 【0031】(乳培地組成)

全脂粉乳 520g  
酵母エキス 0.75g  
水 2100g

\*溶解後、135℃で5秒間、滅菌処理した。

#### 【0032】

##### 【表1】

|         | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|---------|-----|------|------|------|
| 対 照     | 100 | 64.2 | 39.3 | 22.1 |
| 攪拌操作4時間 | 100 | 68.5 | 52.5 | 41.2 |
| 攪拌操作2時間 | 100 | 66.0 | 40.3 | 29.4 |

単位 (%)

\*

|               | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|---------------|-----|------|------|------|
| 対 照           | 100 | 64.2 | 39.3 | 22.1 |
| 温度上昇(37℃)     | 100 | 66.6 | 42.1 | 25.0 |
| 温度上昇(40℃)     | 100 | 75.0 | 52.1 | 38.0 |
| 温度上昇(42℃、4時間) | 100 | 81.6 | 71.4 | 51.6 |
| 温度上昇(42℃、2時間) | 100 | 80.7 | 68.2 | 45.7 |

単位 (%)

【0037】この結果から明らかなように、培養途中で培養温度を34℃から37、42℃に上昇させて製造した製品は、34℃一定で培養して製造した製品よりも高い生残性を示していた。処理温度は37℃よりも42℃の方が、また処理時間は2時間より4時間の方がより高い生残性を示した。

#### 【0038】実施例3

浸透圧を上昇させる方法による生残性改善効果  
以下の方法にて、浸透圧を上昇させる方法のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0039】すなわち、3L容コルベンに実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベY※50

\*【0033】この結果から明らかなように、培養途中で一定期間攪拌を行って製造した製品は、未攪拌で培養して製造した製品の場合よりも高い生残性を示していた。

#### 【0034】実施例2

温度を上昇させる方法による生残性改善効果

以下の方法にて、温度を上昇させる方法のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0035】すなわち、3L容コルベンに実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベY IT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11～12時間培養し、 $1.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.7であった。この培養液の温度を37、40、42℃の各温度に上昇させた後、4時間培養を継続した培養液、及び42℃に昇温後2時間培養してから34℃まで温度を下げ、更に2時間培養した培養液を得た。これらの培養液は、菌数が $1.5 \times 10^9$ /ml、pH5.3であった。冷却した培養液に、冷バラチノース溶液を終濃度0.33モルとなるように添加し、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中に温度を上昇させずに $3.0 \times 10^9$ /mlまで培養した培養液を用いた製品も同様に作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表2に示す。

#### 【0036】

##### 【表2】

※IT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11～12時間培養し、 $1.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.7また浸透圧は約640mOsmであった。この培養液に34℃に加温したバラチノース溶液(約1300mOsm)を終濃度0.33モルとなるように添加した後、4時間培養を継続し、 $3.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.4、浸透圧は約950mOsmであった。冷却した培養液を、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中にバラチノース溶液を添加せずに $3.0 \times 10^9$ /mlまで培養した培養液に、冷バラチノース溶液を添加した製品も作製した。

この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表3に示す。

【0040】

【表3】

|       | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|-------|-----|------|------|------|
| 対 照   | 100 | 64.2 | 39.3 | 22.1 |
| 浸透圧上昇 | 100 | 79.2 | 58.0 | 40.4 |

単位 (%)

【0041】この結果から明かなように、培養途中で温パラチノース溶液を添加し、浸透圧を上昇させて製造した製品は、浸透圧を上昇させずに培養して製造した製品の場合よりも高い生残性を示していた。

【0042】実施例4

培養液のpHを変化させる方法による生残性改善効果

以下の方法にて、培養液のpHを変化させる工程のビフィ

ドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。すな\*

|              | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|--------------|-----|------|------|------|
| 対 照          | 100 | 64.8 | 40.0 | 19.5 |
| pH 4. 4. 2時間 | 100 | 65.3 | 49.0 | 28.2 |
| pH 4. 4. 4時間 | 100 | 75.1 | 52.0 | 38.0 |
| pH 5. 4. 4時間 | 100 | 66.6 | 50.7 | 31.0 |

単位 (%)

【0044】表4から明かなように、培養途中にpHを低下させ製造した製品は、対照よりも高い生残性を示していた。処理後のpHは5.4よりも4.4の方が、また処理時間は2時間より4時間の方が高い生残性を示した。

【0045】実施例5

浸透圧を上昇させる工程による生残性改善効果

以下の方法にて、浸透圧を上昇させる工程のビフィドバクテリウム属細菌生残性改善効果を検討した。

【0046】すなわち、3リットル容コルベンに実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11~12時間培養し、 $1.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.7また浸透圧は約590mOsmであった。この培養液に34℃に加温した1Mパラチノース溶液を培地の浸透圧との差が74、134、230、262、353mOsmとなるように添加した後、4時間培養を継続し、 $1.5 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.3であった。冷却したそれぞれの培養液に冷却した1Mパラチノース溶液をいずれも0.33Mとなるように添加した後、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、培養中にパラチノース溶液を添\*

\*わち、3リットル容コルベンに下に実施例1と同じ乳培地を添加し、ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT4065株を1%接種した。綿栓をした後、34℃、11~12時間培養し、 $1.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液のpHは5.7であった。2Mリンゴ酸溶液を用いて培養液のpHを4.4、5.4に低下させ34℃にて4時間培養を継続した。pH4.4のもののみ培養2時間の培養液も得た。いずれも菌数 $1.5 \times 10^9$ /mlの培養液であった。冷却したそれぞれの培養液に2M水酸化ナトリウム溶液を添加しpHを5.3とした後、冷パラチノース溶液を終濃度0.33モルとなるように添加し、ガラス製の試験管に充填し空気に触れないようにブチル栓で密栓した。また、対照として、pHを変化させる処理を施さずに $1.5 \times 10^9$ /mlまで培養した培養液を用いた製品も同様に作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表4に示す。

【0043】

【表4】

※加せず $1.5 \times 10^9$ /mlまで培養した培養液に、冷パラチノース溶液を添加した製品も作製した。この様にして得られた製品群の10℃保存時における7、14、21日の生残率を測定した。結果を表5に示す。

【0047】

【表5】

| 浸透圧差mOsm | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|----------|-----|------|------|------|
| 対 照      | 100 | 64.6 | 40.0 | 21.4 |
| 74       | 100 | 59.1 | 41.0 | 21.2 |
| 134      | 100 | 65.4 | 42.4 | 21.5 |
| 230      | 100 | 64.6 | 42.6 | 28.6 |
| 262      | 100 | 67.4 | 43.4 | 35.3 |
| 353      | 100 | 79.8 | 57.9 | 39.8 |

単位 (%)

【0048】表5から明かなように、浸透圧差が134を超えると、対照よりも高い生残性を示していた。

【0049】実施例6

溶存酸素量を増加させる方法による生残性改善効果

菌株としてビフィドバクテリウム・ロンガムYIT4021を用いた以外は実施例1と同様の条件で、溶存酸素

量の生残性への影響を検討した。その結果ビフィドバクテリウム・ロンガムでも同様に生残性改善効果が得られた。

#### 【0050】実施例7

以下の基本培養条件に各種の条件を適用して発酵乳を調製し、保存時の生残性を比較した。

(基本条件) 粉乳420gとミースト(アサヒビール社製)0.6gを水1700gに溶解し、135℃で3.5秒間滅菌したものを3リットル容コルベンに2L分注し、乳培地とした。この乳培地に、ビフィドバクテリウム・プレーベYIT4064株を1%、ラクトバチルス・ガセリYIT0168を0.1%接種した。綿栓した後、34℃でビフィドバクテリウム・プレーベの菌数が $1.5 \times 10^9$ となるまで培養し、培養液とした。この培養液を10℃に冷却し、4℃の1Mグルコース溶液1Lと混合し、均質化機で150kg/cm<sup>2</sup>の圧力で均質化し発酵乳とした。こうして得られる発酵乳(コントロール)と以下の各種条件を具備したサンプルを調製した。

実施品1: 培養終了4時間前から2時間攪拌を行い、攪拌中は培養液の溶存酸素が飽和状態になるように維持した。

実施品2: 培養終了4時間前から培養終了まで培養温度を42℃に維持した

実施品3: 培養液と1Mグルコース溶液との混合を34℃で行った。

実施品4: ビフィドバクテリウム・プレーベの菌数が $2 \times 10^8$ の段階でクエン酸を添加し、pHを1.0低下させ2時間維持した後、水酸化ナトリウム溶液で元のpHに戻し、培養を継続した。

実施品5: 培養終了4時間前に1Mグルコース溶液との混合を攪拌しながら42℃で行い、培養終了まで攪拌及び42℃恒温を継続した。

こうして得られた発酵乳をガラス瓶に充填、密封し、10℃で21日間静置保存した。結果を表6に示す。

#### 【0051】

【表6】

|        | 1日目 | 7日目  | 14日目 | 21日目 |
|--------|-----|------|------|------|
| コントロール | 100 | 60.6 | 33.4 | 19.1 |
| 実施品1   | 100 | 67.3 | 42.5 | 30.2 |
| 実施品2   | 100 | 76.3 | 64.9 | 42.2 |
| 実施品3   | 100 | 75.5 | 56.0 | 38.8 |
| 実施品4   | 100 | 69.9 | 52.4 | 40.3 |
| 実施品5   | 100 | 85.2 | 77.0 | 64.1 |

単位 (%)

【0052】表6から明らかなとおり、ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を具備することで、優れた生残性を有する発酵乳を製造できることがわかった。特に培養終了時から4時間程度前までに該工程を適用した場合の生残性改善効果が優れていた。また、本品は21日保存後でも色調変化、分離、沈殿等はほとんど見られず、良好な安定性を示した。更に、本品は、官能面でも全く問題ない優れた風味を有していた。

#### 【0053】実施例8 発酵乳の製造

3リットル容コルベンに全脂粉乳520gとミースト(アサヒビール社製)0.75gを水2100gに溶解し、135℃で5秒間滅菌し、乳培地とした。この乳培地に、ビフィドバクテリウム・プレーベYIT4065株を1%、ラクトバチルス・アシドフィルスを0.1%接種した。綿栓をした後、34℃、11~12時間培養し、 $1.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液に34℃に加温した1Mパラチノース溶液0.84Lを添加した後、4時間培養を継続した。 $2.0 \times 10^9$ /mlの培養液を得た。この培養液を均質機にかけ均質化したものを発酵乳とした。この発酵乳のpHは5.4、乳酸菌数は $5 \times 10^7$ /ml、ビフィズス菌数は $1 \times 10^9$ /mlであった。

#### 【0054】

【発明の効果】本発明により、ビフィドバクテリウム属細菌の代謝を停止させずに増殖速度を低下させる工程を単独もしくは組み合わせることでビフィドバクテリウム属細菌の培養時に導入すれば、ビフィドバクテリウム属細菌の生残性を改善し、摂取時の生理効果を高めることが可能となる。また、本発明方法によって得られた培養液又は培養物は良好な風味を有しており、多種類の飲食品に用いることができる。

## フロントページの続き

(72)発明者 三浦 みか  
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内  
(72)発明者 池邨 治夫  
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内  
(72)発明者 森下 ▼隆▲  
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会  
社ヤクルト本社内

Fターム(参考) 4B001 AC02 AC30 AC31 AC50 AC99  
BC03 BC14 EC05  
4B018 LB07 LB08 LE04 LE05 MD28  
MD29 MD81 MD86 MD87 ME02  
ME11 MF13  
4B065 AA21X BB15 BB16 BB24  
BB29 BC01 BC02 BC03 BC14  
BC50 BD07 BD12 BD36 CA42